

• 短篇论著 •

70 株室间质量评价菌株鉴定差异及其纠正方法探讨

马 爽¹, 汤凤珍², 杜利军², 伍国达³, 冯 峰², 程 璐², 马 翔⁴

1. 广东省广州市花都区妇幼保健院检验科, 广东广州 510800; 2. 广东省广州市花都区
人民医院检验科, 广东广州 510899; 3. 广东省江门市中心医院检验科,
广东江门 529030; 4. 广东省广州市花都人爱医院检验科, 广东广州 510800

摘要:目的 探讨对经过全自动微生物分析仪 Vitek 2 Compact、基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪 Vitek MS 鉴定为“不确定”菌, 以及在不同显色平板上产生类似色素菌的进一步鉴定方法, 以明确病原学诊断。
方法 对来自国家卫生健康委临床检验中心与广东省临床检验中心室间质量评价菌株中的“不确定”菌 70 株, 使用不同的鉴定系统结合表型特征、血清学试验进行鉴定, 并对显色平板上产生类似色素的菌株做补充鉴定。
结果 自动化微生物鉴定系统报告的 32 株“不确定”菌中, Vitek 2 Compact 有 65.6% (21/32) 需要进一步鉴定, Vitek MS 有 59.4% (19/32) 需要进一步鉴定, 部分菌株在 2 种自动化微生物鉴定系统间的鉴定结果存在差异; 32 株“不确定”菌经不同鉴定系统、表型特征、血清学试验鉴定, 全部鉴定到种/型水平。对念珠菌平板等 3 种不同显色平板上产生类似色素的 38 株菌的补充鉴定, 结果全部为非目标菌。
结论 通过不同鉴定方法的互补, 可以提高临床微生物鉴定的质量。

关键词: 鉴定差异; 鉴别特征; 方法学; 临床微生物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.01.025

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2022)01-0119-04

文献标志码: A

随着自动化微生物鉴定仪、基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF MS) 的广泛应用, 极大地提高了临床微生物的鉴定能力。由于临床微生物的种、属繁多, 存在多样性、复杂性, 选择的鉴定特征可能难以代表全部的被鉴定菌株, 特别是少见菌、疑难菌、分类“未明确菌”。当“试验组合”不是所鉴定菌属、菌种“独有的”特征时, 会出现不明确、不能鉴定、近缘菌株不能区分的“不确定”结果。自动化微生物鉴定系统根据“固定的”生理生化特征, 不能自动补充鉴别试验, 是导致菌株鉴定为复合群、低分辨率或者不能鉴定的原因之一。显色培养基虽具有快速筛查目标菌的优势, 但对于产生类似色素的菌株还需要进一步鉴别。志贺菌属、沙门菌属、大肠埃希菌 O157、霍乱弧菌等经过生化特征鉴定后, 还需要血清学的确认。微生物的药敏试验需要根据菌株种类选择药物^[1], 因此鉴定结果的错误可能影响到药敏结果的判读和临床用药。为此, 笔者探讨了“不确定”菌株的进一步鉴定, 以得到明确的病原菌鉴定结果^[2-8], 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验菌株 对国家卫生健康委临床检验中心及广东省临床检验中心提供的室间质量评价菌株进行鉴定, 将其中经自动化微生物鉴定系统鉴定为“不确定”菌和在不同显色平板上产生类似色素的菌 (非目标菌) 共 70 株作为试验菌株。

1.2 仪器与试剂 全自动微生物分析仪 Vitek 2 Compact、革兰阳性菌鉴定卡 (GP 卡)、革兰阴性杆菌鉴定卡 (GN 卡) 和 MALDI-TOF MS Vitek MS 均购自法国生物梅里埃公司; DHP-9052 型电热恒温培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司。用于念珠菌、小肠结肠炎耶尔森菌和沙门菌鉴定的显色平板, 采用法国科玛嘉公司生产的干粉配制; 显色平板及哥伦比亚血平板均从广州迪景微生物试剂有限公司购进。微生物生化鉴定微量管以及氧化酶纸片购自杭州滨和微生物试剂有限公司, 丁酸酯酶纸片购自 Remel 公司, 3% 过氧化氢试剂自配。志贺菌属、大肠埃希菌 O157:H7、沙门菌属诊断血清购自丹麦国家血清研究院、中国兰州生物制品研究所。仪器设备均按说明书操作, 所有试剂均在使用有效期内。

1.3 方法 取试验菌株 35℃ 孵育 18~24 h 的血平板生长物进行革兰染色, 革兰阳性菌补充过氧化氢酶试验, 革兰阴性菌补充氧化酶、葡萄糖氧化/发酵 (O/F) 和动力试验。凡菌株在 Vitek 2 Compact、Vitek MS 上鉴定为“不确定”菌的, 行补充试验鉴别。对在显色平板上产生类似色素的菌株, 同时采用 Vitek 2 Compact、Vitek MS 鉴定; 对出现鉴定差异的菌株行补充试验确认。志贺菌属、大肠埃希菌 O157:H7 和沙门菌属菌株采用特异性血清学鉴定 (均做盐水对照)。

2 结果

2.1 试验菌株自动化微生物鉴定系统鉴定结果 70

株试验菌株经 Vitek 2 Compact、Vitek MS 鉴定出现“不确定”菌共计 32 株,见表 1。其中 Vitek 2 Compact 能够鉴定志贺菌属与大肠埃希菌 O157:H7 菌株共 11 株(均经过特异性的血清学鉴定),其他 21 株“不确定”菌需要进一步鉴别到种,占 65.6%(21/32); Vitek MS 能够鉴定鹌鸡肠球菌、铅黄肠球菌、肺炎链球菌、缓症链球菌、新洋葱伯克霍尔德菌、快速生长分枝杆菌、诺卡菌共 13 株,其他 19 株“不确定”菌需要进一步鉴别到种,占 59.4%(19/32);部分菌株在两种鉴定系统间出现鉴定差异。从鉴定的菌种比对看出, Vitek MS 较 Vitek 2 Compact 可鉴定的微生物种类增多,具有对 Vitek 2 compact 不能鉴定菌株鉴定的优势,但是,其对于志贺菌属菌株、大肠埃希菌 O157:H7 不能明确鉴定。

2.2 “不确定”菌 Vitek 2 Compact 与 Vitek MS 鉴定

结果的差异及鉴别 通过不同鉴定系统及表型特征的互补、结合血清学试验,均可以鉴定到种/型。通过同一菌株在不同系统上的鉴定比对,大多数菌种的鉴定结果是相符合的,但少数菌种有差异,见表 2。

表 1 自动化微生物鉴定系统的“不确定”菌

菌株	菌株数 (n)	菌株	菌株数 (n)
嗜水气单胞菌	6	快速生长分枝杆菌	1
阴沟肠杆菌阴沟亚种	2	巴西诺卡菌	1
鹌鸡肠球菌	2	福氏志贺菌	4
铅黄肠球菌	2	鲍氏志贺菌	2
肺炎链球菌	5	痢疾志贺菌 2 型	2
缓症链球菌	1	宋内志贺菌	2
新洋葱伯克霍尔德菌	1	大肠埃希菌 O157:H7	1

表 2 “不确定”菌 Vitek 2 Compact 与 Vitek MS 鉴定结果的差异及鉴别

菌株	Vitek 2 Compact	Vitek MS	鉴别要点
嗜水气单胞菌	嗜水/豚鼠气单胞菌	嗜水/豚鼠气单胞菌	嗜水气单胞菌 VP 试验(+),豚鼠气单胞菌 VP 试验(-)
鹌鸡肠球菌	鹌鸡肠球菌	鹌鸡肠球菌	该菌 NIN(+)
铅黄肠球菌	铅黄肠球菌	铅黄肠球菌	该菌 NIN(-),并产生黄色色素
阴沟肠杆菌阴沟亚种	阴沟肠杆菌复合群	阴沟/神户/阿氏肠杆菌	阴沟肠杆菌阴沟亚种 VP 试验(+),其他种 VP 试验(-)
肺炎链球菌	肺炎链球菌	肺炎链球菌	该菌胆汁溶菌试验(+),奥普托欣试验敏感
缓症链球菌	缓症链球菌	缓症链球菌	该菌胆汁溶菌试验(-),奥普托欣试验耐药
福氏志贺菌	志贺菌群	大肠埃希菌	志贺菌动力试验(-),KIA 试验(-/+),血清学鉴定
鲍氏志贺菌	志贺菌群	大肠埃希菌	同上
痢疾志贺菌 2 型	志贺菌群	大肠埃希菌	同上
宋内志贺菌	宋内志贺菌	大肠埃希菌	同上
大肠埃希菌 O157:H7	大肠埃希菌 O157	大肠埃希菌	大肠埃希菌 O157 MUG 试验(-),山梨醇试验(-),血清学鉴定
新洋葱伯克霍尔德菌	洋葱伯克霍尔德菌群	新洋葱伯克霍尔德菌	见表 5
快速生长分枝杆菌	不能鉴定	可以鉴定到种	抗酸染色阳性杆菌,在固体培养基上 7 d 内生长菌落
巴西诺卡菌	不能鉴定	巴西诺卡菌	根据菌落特征、菌体形态及弱抗酸性,初步鉴定为诺卡菌, Vitek MS 有鉴定优势

注: + 为阳性; - 为阴性; NIN 为马尿酸钠水解试验; KIA 为克氏双糖铁琼脂培养基; MUG 为 β -葡萄糖醛酸糖苷酶。

2.3 试验菌株显色平板筛选结果 70 株试验菌株在不同显色平板上产生类似色素的菌有 38 株,均确定为非目标菌(包含自动化鉴定系统鉴定的同种菌株),见表 3。

表 3 不同显色平板筛选的非目标菌

显色平板类型	菌株数(n)	菌落特征性色素	非目标菌
念珠菌平板	2	绿色	都柏林念珠菌
CIN 平板	6	红色	嗜水气单胞菌
CIN 平板	4	红色	温和气单胞菌
沙门菌平板	6	红色	嗜水气单胞菌

续表 3 不同显色平板筛选的非目标菌

显色平板类型	菌株数(n)	菌落特征性色素	非目标菌
沙门菌平板	4	红色	温和气单胞菌
沙门菌平板	4	红色	类志贺邻单胞菌
沙门菌平板	4	红色	摩根摩根菌摩根亚种
沙门菌平板	2	红色	鲍氏志贺菌
沙门菌平板	2	红色	痢疾志贺菌 2 型
沙门菌平板	4	红色	大肠埃希菌

注: CIN 为头孢磺啉-氯苯酸-新生霉素, CIN 平板用于小肠结肠炎耶尔森菌筛查。

2.4 非目标菌 Vitek 2 Compact 与 Vitek MS 鉴定结果的差异及鉴别 都柏林念珠菌在念珠菌显色平板也是绿色菌落, 对于此平板上生长的绿色菌落的菌株需要鉴别; 气单胞菌在 CIN 平板也是红色菌落, 根据氧化酶试验(+)即可排除小肠结肠炎耶尔森菌; 在沙门菌显色平板上为红色菌落的非沙门菌包括多个菌属, 通过氧化酶、苯丙氨酸脱氨酶、动力、MUG 等试验鉴别, 见表 4。

2.5 新洋葱伯克霍尔德菌鉴定 新洋葱伯克霍尔德菌在血平板上 35℃ 孵育 24 h, 菌落细小, 延长孵育时

间菌落增大, 圆形、凸起、光滑、湿润。该菌为革兰阴性杆菌, 氧化酶试验(+)、葡萄糖 O/F 试验为氧化型。洋葱伯克霍尔德菌种间的表型特征非常相似, 即使补充试验鉴别, 菌种的鉴定仍然困难, MALDI-TOF MS 有鉴别优势。新洋葱伯克霍尔德菌在 Vitek 2 Compact 上的鉴定结果为洋葱伯克霍尔德菌群(置信度 94.0%); Vitek MS 质谱仪鉴定结果为新洋葱伯克霍尔德菌(置信度 99.9%)。如果需要进一步鉴定到种水平, 其鉴别特征见表 5。

表 4 非目标菌 Vitek 2 Compact 与 Vitek MS 鉴定结果的差异及鉴别

非目标菌	显色平板及特征性色素	Vitek 2 Compact	Vitek MS	与目标菌的鉴别要点
都柏林念珠菌	念珠菌平板, 绿色	都柏林念珠菌	都柏林念珠菌	自动化鉴定系统可以鉴别
嗜水气单胞菌	CIN 平板, 红色	嗜水/豚鼠气单胞菌	嗜水/豚鼠气单胞菌	氧化酶试验(+)
温和气单胞菌	CIN 平板, 红色	温和气单胞菌	温和气单胞菌	氧化酶试验(+)
嗜水气单胞菌	沙门菌平板, 红色	嗜水/豚鼠气单胞菌	嗜水/豚鼠气单胞菌	氧化酶试验(+)
温和气单胞菌	沙门菌平板, 红色	温和气单胞菌	温和气单胞菌	氧化酶试验(+)
类志贺邻单胞菌	沙门菌平板, 红色	类志贺邻单胞菌	类志贺邻单胞菌	氧化酶试验(+)
摩根摩根菌摩根亚种	沙门菌平板, 红色	摩根摩根菌摩根亚种	摩根摩根菌摩根亚种	苯丙氨酸脱氨酶试验(+)
鲍氏志贺菌	沙门菌平板, 红色	志贺菌群	大肠埃希菌	常规生化+血清学鉴定
痢疾志贺菌 2 型	沙门菌平板, 红色	志贺菌群	大肠埃希菌	常规生化+血清学鉴定
大肠埃希菌	沙门菌平板, 红色	大肠埃希菌	大肠埃希菌	常规鉴定

表 5 洋葱伯克霍尔德菌群种间鉴别特征

试验类别	新洋葱伯克霍尔德菌	洋葱伯克霍尔德菌	欺瞒伯克霍尔德菌	多食伯克霍尔德菌	越南伯克霍尔德菌
氧化酶试验	+	v	+	+	+
麦康凯生长试验	v	+	+	+	v
蔗糖产酸试验	+	+	—	—	+
赖氨酸脱羧酶试验	+	+	—	v	+
明胶酶试验	v	+	—	—	—

注: + 为阳性; — 为阴性; v 为不定。

3 讨 论

任何微生物鉴定系统都有鉴定菌种的范围, 实验室人员要了解应用系统的鉴定菌谱。通常自动化微生物鉴定系统能够对大多数临床常见菌株鉴定到种, 但对少部分菌株只能鉴定到复合群, 需要补充鉴别试验才能鉴定到种水平, 这关系到药敏试验的结果解释。同一菌株在不同系统上进行鉴定比对, 少数菌株有差异, 这会导致实验室间、或者实验室内使用不同的鉴定系统的结果不符合, 因此, 微生物实验室需要重视类似菌株的鉴别, 做到准确基础上的可比。Vitek 2 Compact 操作手册指出了一些菌属、菌群的菌株需要进一步鉴别。

不同菌属的培养条件、菌落形态、色素、气味以及染色性质、菌体形态、动力等不尽相同, 甚至有“独特性”, 这是自动化微生物鉴定系统尚不能替代的。细菌的革兰染色是全自动微生物分析仪鉴定的重要方向性试验, 如果革兰阴性菌错用 GP 卡可能有鉴定结果, 但得到的结果南辕北辙, 反之亦然。而显色平板是专为目标菌的快速“筛选”研制的, 其根据微生物特定的酶水解底物显色, 且目标菌在此培养基上生长良

好, 显色快、颜色鲜艳而容易识别。虽然显色平板中的抑菌剂会抑制“杂菌”的生长, 但是, 本试验在念珠菌等 3 种显色平板上观察到 38 株产生类似色素的菌株, 其鉴定的结果都不是目标菌株。因此, 不能仅仅根据在显色平板上菌落的色素而未经鉴定就直接发出报告, 还需要进行鉴定确认, 谨防误报。因此, 对于自动化微生物鉴定系统鉴定为“不确定”、或者显色培养基“筛查”的菌株, 需通过不同的方法互补, 提高微生物鉴定的质量。快速生长分枝杆菌、诺卡菌根据培养特性、菌落形态、菌体抗酸染色特征, 可以初步识别。

MALDI-TOF MS 尚不能准确鉴定志贺菌属细菌、大肠埃希菌 O157, 可能对患者的诊治造成影响。对于来自粪便标本报告的大肠埃希菌, 要做进一步甄别, 报告正确的病原学结果, 其对临床治疗有重要意义。

本研究对 70 株试验菌株的鉴定结果与国家卫生健康委临床检验中心及广东省临床检验中心反馈的鉴定结果一致。本研究列举了“不确定”菌的鉴定及鉴别, 但存在鉴定差异的菌株不仅限于此^[9-10], 由于试验菌株数量有限, 有待进一步观察。下列菌株鉴定错

误可能影响疾病的诊断与治疗。

病例概况 1: 福氏志贺菌、鲍氏志贺菌、痢疾志贺菌 2 型及宋内志贺菌从不洁饮食腹泻患者的粪便中检出, 部分菌株也从健康带菌者粪便中检出。志贺菌属是主要的肠道病原菌之一, 引起人类细菌性痢疾, 严重感染时可出现全身中毒症状。

病例概况 2: 大肠埃希菌 O157:H7 从一名 14 岁男性腹痛患儿的血便中检出。大肠埃希菌 O157 为高致病性细菌, 能导致出血性肠炎、甚至严重的溶血性尿毒症综合征。

病例概况 3: 新洋葱伯克霍尔德菌从一名 84 岁女性呼吸机相关性肺部感染患者的吸痰标本中检出。新洋葱伯克霍尔德菌是此菌属最常见的菌种之一, 肺部感染难以治疗, 由于感染的患者术后预后差, 将其感染视为肺移植术的绝对禁忌证。

病例概况 4: 鹌鸡肠球菌从一名 78 岁女性肾盂肾炎患者的尿液中分离出来。鹌鸡肠球菌、铅黄肠球菌还可引起腹腔、盆腔及胆管等部位感染。铅黄肠球菌和鹌鸡肠球菌均对万古霉素天然低水平耐药, 而粪肠球菌和屎肠球菌对万古霉素是获得性耐药, 这 2 类肠球菌的鉴别对临床治疗有重要意义。

综上所述, 通过不同鉴定方法的互补, 可以提高临床微生物的鉴定质量。

参考文献

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance

• 短篇论著 •

standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S30[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2020.

- [2] 胡继红, 马筱玲, 王辉, 等. MAL-TOF MS 在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(4): 241-249.
- [3] JORGENSEN J H, PFALLER M A. 临床微生物学手册[M]. 王辉, 马筱玲, 钱渊, 等译. 11 版. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2017.
- [4] 王辉, 马筱玲, 钱渊, 等主译. 临床微生物学手册[M]. 12 版. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2021.
- [5] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Abbreviated identification of bacteria and yeast; approved guideline: MA35-A2[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2010.
- [7] 马翔, 孙丽君. 传统方法在临床细菌学鉴定中的作用[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(7): 453-454.
- [8] 马翔, 苏建荣. 简明临床细菌与真菌鉴定图谱[M]. 广州: 广东科技出版社, 2020.
- [9] 田宏攀, 肖潇, 程小欢, 等. 痰液多拉菌鉴定方法分析[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(7): 739-744.
- [10] 郭玉迎, 沈健, 赵水娣, 等. 侵肺戴阿李斯特菌致菌血症 1 例[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(2): 159-160.

(收稿日期: 2021-06-25 修回日期: 2021-11-10)

颅内感染患者 HBP 表达特征及其与预后的关系研究

魏书玲, 张 丹, 安 翼

内蒙古自治区赤峰市医院神经内科, 内蒙古赤峰 024000

摘 要:目的 分析颅内感染患者脑脊液及血清肝素结合蛋白(HBP)表达特征及其与患者预后的相关性。方法 以该院 2017 年 1 月至 2019 年 6 月收治的 98 例颅内感染患者为感染组, 另选取同期 50 例体检健康者为健康组, 测定所有受试者脑脊液 HBP、血清 HBP、C 反应蛋白(CRP)、内毒素(ETX)及白细胞计数(WBC)水平, 比较这些指标在感染组与健康组、不同程度及不同预后颅内感染患者间的水平差异, 分析脑脊液及血清 HBP 水平与颅内感染患者预后的关系。结果 感染组脑脊液 HBP、血清 HBP、CRP、ETX 及 WBC 水平均高于健康组($P < 0.05$); 轻度感染、中度感染、重度感染患者脑脊液 HBP、血清 HBP、CRP、ETX 及 WBC 水平各组间比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 颅内感染存活患者脑脊液 HBP、血清 HBP、CRP、ETX 及 WBC 水平均低于死亡患者($P < 0.05$); Logistic 回归模型分析显示, 脑脊液及血清 HBP 水平升高是颅内感染患者预后的独立危险因素($P < 0.05$)。结论 颅内感染患者脑脊液及血清 HBP 水平较健康人群异常升高, 感染越严重 HBP 水平越高, HBP 水平升高提示颅内感染患者更高的死亡风险, 可作为颅内感染预后的预测指标。

关键词: 颅内感染; 脑脊液; 肝素结合蛋白; 预后

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.01.026

中图法分类号: R181.3

文章编号: 1673-4130(2022)01-0122-04

文献标志码: A

颅内感染是所有医院感染中严重程度最高的一类, 具体表现主要有脑脓肿、脑炎以及脑膜炎^[1]。细